

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДТИПОВ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ОЖГОВОМ ШОКЕ

Савченко С.В.¹, Ощепкова Н.Г.¹, Бгатова Н.П.², Кузнецов Е.В.¹, Летягин А.Ю.²,
Верещагин Е.И.¹, Саматов И.Ю.¹

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, e-mail: dr.serg62@yandex.ru;

²НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Ведущей причиной смерти у комбустиологических пациентов, наряду с ожоговой септикотоксемией, является ожоговый шок, развивающийся с первых минут после получения термических ожогов. Целью исследования явилось изучение особенности ультраструктуры основных подтипов митохондрий кардиомиоцитов при тяжелом ожоговом шоке. Проведено ультраструктурное исследование подтипов митохондрий миокарда левого желудочка сердца. Забор образцов миокарда во время ранней секции, через 2 часа после констатации биологической смерти у погибших (N=5) от тяжелого ожогового шока (3 мужчины и 2 женщины); возрастная категория 32-44 года. Результаты и их обсуждение. В результате стереологического морфометрического исследования основных подтипов митохондрий кардиомиоцитов – интерфибриллярных, субсарколеммальных и перинуклеарных при ожоговом шоке, были выявлены ультраструктурные изменения, характеризующиеся статистически значимым снижением концентрации крист у всех подтипов митохондрий. Наряду с этими изменениями имела место тенденция к изменению формы митохондрий, что может быть связано с набуханием органелл, а также отмечено статистически значимое уменьшение площади перинуклеарных митохондрий. Ультраструктурные изменения интерфибриллярных митохондрий, касающиеся меньшего снижения количества крист этого подтипа органелл, в сравнении с субсарколеммальными и перинуклеарными органеллами, могут свидетельствовать о более выраженной толерантности этого подтипа митохондрий к альтерации кардиомиоцитов при ожоговом шоке.

Ключевые слова: ультраструктура, морфометрия, подтипы митохондрий, ожоговый шок, миокард.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN MITOCHONDRIAL SUBTYPES OF CARDIOMYOCYTES IN BURN SHOCK

Savchenko S.V.¹, Oshchepkova N.G.¹, Bgatova N.P.², Kuznetsov E.V.¹, Letyagin A.Yu.²,
Vereshchagin E.I.¹ Samatov I.Yu.¹

¹Novosibirsk State Medical University Novosibirsk, Novosibirsk, e-mail: dr.serg62@yandex.ru;

²Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Research Center – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

The leading cause of death in combustiological patients, along with burn septicotoxemia, is burn shock, which develops from the first minutes after receiving thermal burns. The aim of the study was to study the features of the ultrastructure of the main subtypes of mitochondria of cardiomyocytes in severe burn shock. Ultrastructural study of subtypes of mitochondria of the myocardium of the left ventricle of the heart was performed. Sampling of myocardial samples during the early section, 2 hours after the biological death of the deceased (N=5) from severe burn shock (3 men and 2 women); the age category is 32-44 years. Results and their discussion. As a result of a stereological morphometric study of the main subtypes of mitochondria of cardiomyocytes – interfibrillary, subsarcolemal and perinuclear in burn shock, ultrastructural changes were revealed, characterized by a significant decrease in the concentration of crist in all subtypes of mitochondria. Along with these changes, there was a tendency to change the shape of mitochondria, which may be associated with the swelling of organelles, and there was also a significant decrease in the area of perinuclear mitochondria. Ultrastructural changes in interfibrillary mitochondria, reflecting a less pronounced decrease in the number of crystals of this organelle subtype compared to subsarcolemal and perinuclear organelles, may indicate a greater tolerance of this mitochondrial subtype to cardiomyocyte alteration in burn shock.

Keywords: ultrastructure, morphometry, mitochondrial subtypes, burn shock, myocardium.

Ведущей причиной смерти у комбустиологических пациентов, наряду с ожоговой септикотоксемией, является ожоговый шок, развивающийся с первых минут после получения термических ожогов [1]. При тяжелом ожоговом шоке достаточно быстро формируется острая систолическая и диастолическая недостаточность миокарда, что приводит к летальному исходу [2; 3].

При изучении механизмов, лежащих в основе развития сократительной недостаточности миокарда левого желудочка при ожоговом шоке, информативным является проведение морфологических исследований на ультраструктурном уровне. Учитывая, что наиболее чувствительными органеллами кардиомиоцитов, реагирующими на малейшие изменения гомеостаза, являются митохондрии [4-6], нам представилось целесообразным проведение стереологического морфометрического исследования ультраструктуры митохондрий, играющих важную роль в энергетическом обеспечении сократительной способности миокарда. При планировании и оформлении дизайна исследования предполагалось изучить в кардиомиоцитах основные подтипы митохондрии с учетом их локализации и функциональной нагрузки: интермиофибрилярные, субсарколеммальные, и перинуклеарные [7; 8].

Цель исследования: выявить особенности ультраструктуры основных подтипов митохондрий кардиомиоцитов при тяжелом ожоговом шоке.

Материал и методы исследования. Исследуемый материал миокарда передней стенки левого желудочка сердца был получен при проведении раннего секционного исследования в случаях летальных наблюдений пациентов, умерших от тяжелого ожогового шока в областном комбустиологическом центре. Забор образцов миокарда осуществляли на аутопсии, проводимой через 2 часа после констатации биологической смерти у погибших (N=5) от тяжелого ожогового шока (3 мужчины и 2 женщины; возрастная категория 32-44 года). Все погибшие имели термические ожоги 2-4 степени, площадью от 50 до 80%, полученные на пожарах, т.е. при действии пламени. Летальный исход всех пациентов был связан с развитием тяжелого ожогового шока при переходе его в рефрактерную стадию в первые двое суток с момента получения ожоговой травмы. В качестве контрольной группы использовали аутопсийный материал, который был забран при проведении ранней аутопсии, через 2 часа после констатации биологической смерти у доставленных машиной скорой помощи скоропостижно умерших мужчин (N=3) от «внезапной сердечной смерти» (возрастная категория 35-45 лет). Все аутопсии проводились в танатологическом отделе ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы», куда были доставлены тела умерших. Забор материала осуществлялся на основании Приказа Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении Порядка организации и производства

судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации», в частности ст. 72.1 («... в обязательном порядке производится взятие объектов трупа и его частей и направление их для судебно-гистологической экспертизы в случаях наступления смерти в организациях здравоохранения»), ст. 49 («...для проведения лабораторных и (или) инструментальных экспертных исследований из трупа могут быть взяты какие-либо его части, внутренние органы и ткани...»), ст. 50 («...перечень и количество биологических объектов, виды инструментальных и (или) лабораторных исследований определяет эксперт...»).

При выполнении работы с трупным материалом соблюдались определенные требования и условия, изложенные в Федеральном законе «О погребении и похоронном деле» с изменениями от 28 июля 2012 г., в частности ст. 5 («Волеизъявление лица о достойном отношении к его телу после смерти...»). Кроме того, при проведении работы были соблюдены определенные требования и условия, изложенные в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА, 2000 г.).

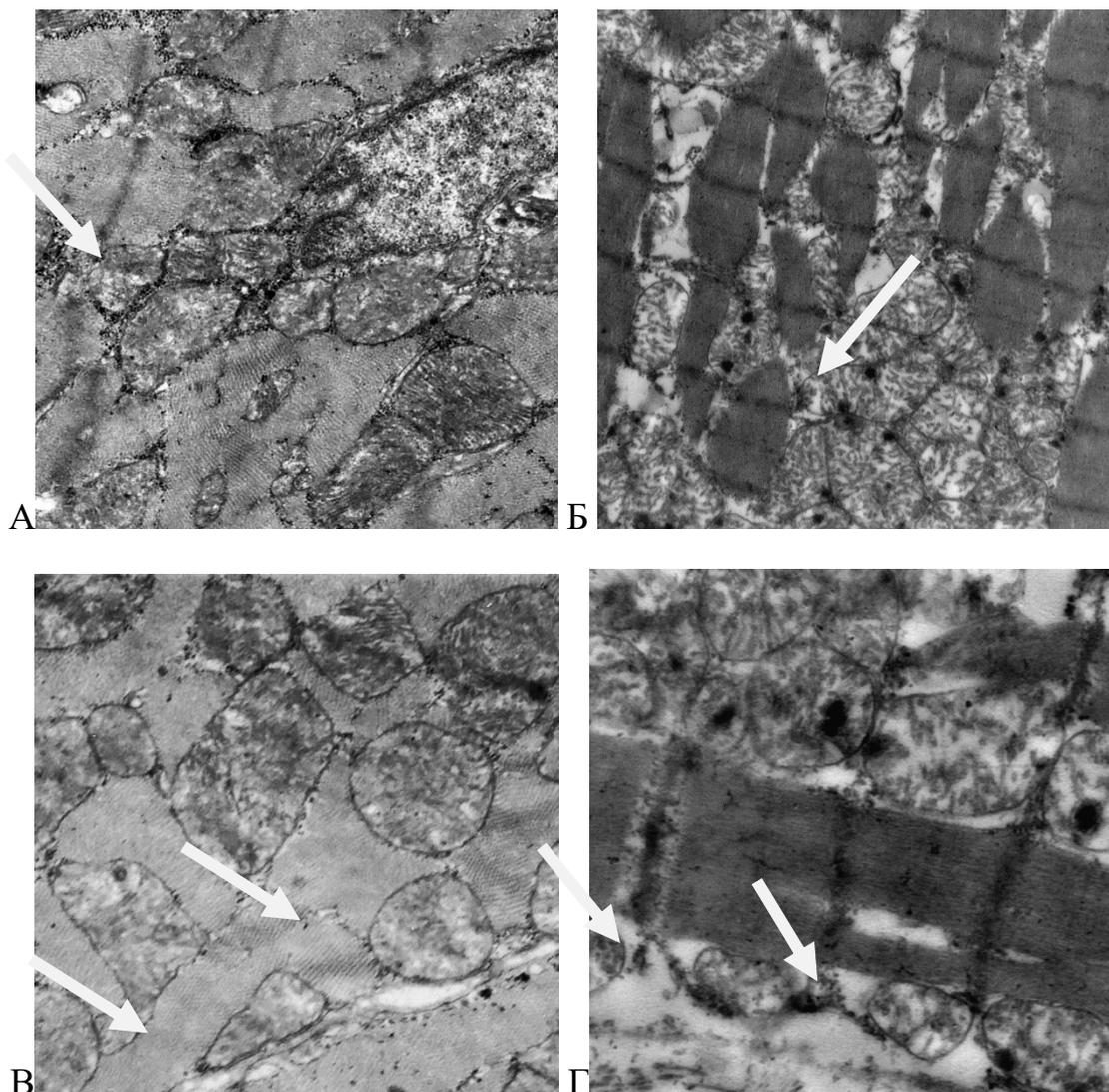
Для исследования характера ультраструктурных изменений основных подтипов митохондрий кардиомиоцитов фрагменты миокарда левого желудочка фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в 1%-ном растворе OsO_4 на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиновым синим и изучали под световым микроскопом LEICA DME компании Leica Microsystems AG (Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 производства компании JEOL (Япония), в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. При увеличении $\times 8000$ получали цифровые микрофотографии кардиомиоцитов.

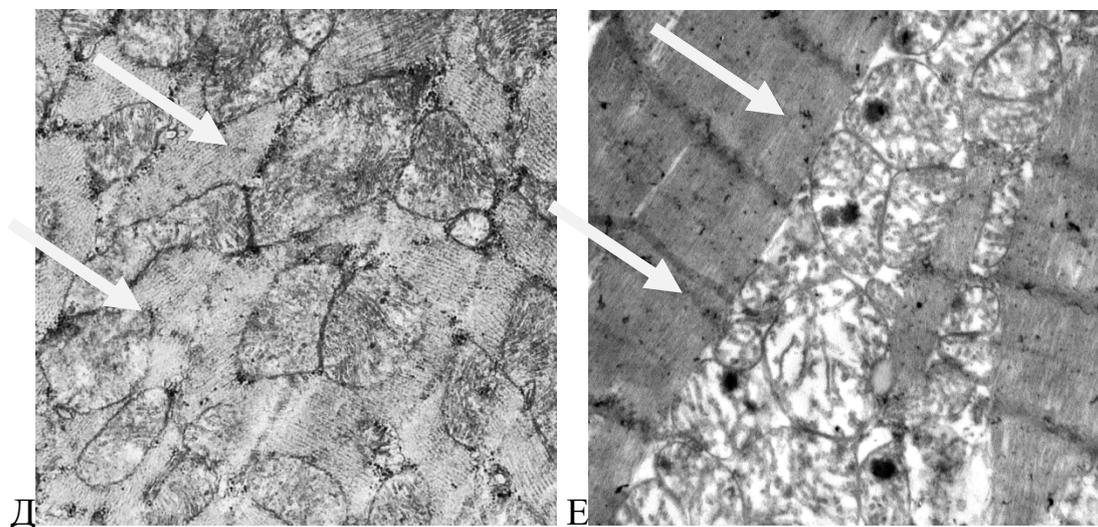
При исследовании ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов выявляли конкретный подтип органелл в соответствии с их локализацией: интермиофибрилярной, субсарколеммальной и перинуклеарной, а также различия органелл по форме и размерам. Для определения формы митохондрий были измерены их диаметры по большой и малой оси. Соотношение диаметров характеризовало степень округлости этих органелл. При величине соотношения диаметров, близкой к 1, митохондрии имели более округлую форму, а при значениях больше 1 – вытянутую форму. Для определения размеров митохондрий находили их площади, используя формулу площади эллипса: $S=D_1 \times D_2 \times \pi$. Кроме того, в программе ImageJ считали и определяли объемную плотность крист митохондрий, используя открытую тестовую систему с шагом 0,1 мкм.

Статистическую обработку проводили, вычисляя значение средней величины и стандартного отклонения. Значимость различий оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни, при уровне достоверности 95% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. Стереологическое морфометрическое изучение основных подтипов митохондрий проводилось в соответствии с их локализацией: перинуклеарных в околядерной зоне, интермиофибриллярных – в межфибриллярных пространствах и субсарколеммальных – по периферии кардиомиоцитов.

При ультраструктурном анализе органелл отличием перинуклеарных митохондрий являлось их расположение в клетке рядом с ядром кардиомиоцитов, образуя при этом кластеры (рис. А, Б). Морфологически в наблюдениях контрольной группы перинуклеарные митохондрии отличались от двух других подтипов митохондрий меньшими размерами и площадью органелл. В отличие от интермиофибриллярных митохондрий среди перинуклеарных митохондрий не встречались органеллы удлиненной формы.





Морфология подтипов митохондрий в кардиомиоцитах в контрольной группе и при ожоговом шоке. Увеличение x8000.

Перинуклеарные митохондрии (стрелки): А – в контрольной группе; Б – при ожоговом шоке. Субсарколеммальные митохондрии (стрелки): В – в контрольной группе; Г – при ожоговом шоке. Интерфибриллярные митохондрии (стрелки): Д – в контрольной группе; Е – при ожоговом шоке

При ожоговом шоке площадь этого подтипа митохондрий была на 38% достоверно меньше, чем в контрольной группе. Результаты стереологического исследования позволили выявить снижение количества крист перинуклеарных митохондрий на 17% (таблица).

Морфологическая характеристика подтипов митохондрий различной локализации в кардиомиоците (M±SD)

Подтипы митохондрий	Группы	Соотношение диаметров митохондрий (Д1/Д2)	Концентрация крист митохондрий (Vv), %	Площадь митохондрий, мкм ²
Интерфибриллярные	Контроль (n=30)	1,98±0,35	63,0±1,80	3,32±0,77
	Ожоговый шок (n=30)	2,33±0,67	55,11±4,01*	3,20±1,62
	Контроль	1,20±0,21#	63,5±2,64	2,74±0,82

Субсарколеммальные	(n=30)			
	Ожоговый шок (n=30)	1,25±0,06	50,66±0,57*	3,01±0,34
Перинуклеарные	Контроль (n=30)	1,12±0,15#	63,0±1,41	2,65±0,13
	Ожоговый шок (n=30)	1,05±0,07	52,5±0,71*	1,64±0,37*

Примечание: Vv – объемная плотность структур (%); n – количество проанализированных митохондрий каждого подтипа в группе; * – отличие от контроля $p < 0,05$.

Субсарколеммальные митохондрии локализовались непосредственно под плазматической мембраной кардиомиоцитов (рис. В, Г). Митохондрии этого подтипа имели округлую или неправильно округлую форму, располагались в виде скоплений органелл по типу цепочек, образуя кластеры клеток. Можно было наблюдать скопление органелл этого типа в участках сближения кардиомиоцитов с кровеносными капиллярами.

В контрольной группе субсарколеммальные митохондрии имели площадь, сходную с интермиофибрилярным подтипом органелл, но при этом данный подтип митохондрий имел более округлую форму, сходную с формой перинуклеарных митохондрий.

При оценке формы и размеров субсарколеммальных митохондрий кардиомиоцитов при ожоговом шоке и в контрольной группе не было выявлено статистически значимых отличий. При изучении структуры крист митохондрий было отмечено статистически значимое снижение их количество на 20% при ожоговом шоке (таблица).

При изучении ультратонких срезов было отмечено, что интермиофибрилярные митохондрии были ориентированы вдоль продольной оси клеток, располагаясь между миофибриллами кардиомиоцитов. Морфологической особенностью этого подтипа митохондрий явилась их более вытянутая между миофибриллами, овальная или цилиндрическая форма, которая в ряде полей могла визуализироваться как несколько прямоугольная (рис. Д, Е).

При оценке особенностей строения трех подтипов органелл контрольной группы интермиофибрилярные митохондрии имели удлиненно овальную форму в сравнении с округлой или овальной формой субсарколеммальных и перинуклеарных митохондрий.

Сравнительное стереологическое морфометрическое исследование интермиофибрилярных митохондрий кардиомиоцитов при ожоговом шоке позволило выявить более вытянутую форму органелл, в сравнении с этим же подтипом органелл контрольной группы, при этом площадь их не различалась. Изучение особенностей

количества крист свидетельствовало о статистически значимом их снижении при ожоговом шоке на 13% (таблица).

На современном этапе исследований ультраструктурной патологии миокарда принято считать, что одними из первых органелл, реагирующих на альтерацию, являются митохондрии [9]. При различной патологии миокарда, в том числе при кардиомиопатиях, отмечают появление в кардиомиоцитах большого количества поврежденных митохондрий с различной выраженностью альтерации [9; 10].

В связи с изложенным становится понятной информативность исследований, направленных на изучение характера ультраструктурных изменений подтипов митохондрий кардиомиоцитов (интермиофибриллярных, субсарколеммальных и перинуклеарных) с учетом их функциональных особенностей в преобразованиях окислительного потенциала, поглощения кальция и митохондриальной проницаемости [10].

Учитывая, что митохондрии имеют собственный геном, митохондриальная ДНК обеспечивает синтез части митохондриальных белков, а репликация митохондрий контролируется ядерной ДНК и объясняет тесный контакт митохондрий с ядром [9], становится важным тот факт, что именно перинуклеарные митохондрии при ожоговом шоке имели более выраженные ультраструктурные изменения, характеризующиеся деструкцией крист и достоверным уменьшением площади этого подтипа органелл. Более выраженные ультраструктурные изменения перинуклеарных митохондрий могут быть связаны с развитием апоптоза клеток.

Наряду с изменениями ультраструктуры перинуклеарных митохондрий заслуживает внимание выявленный, менее выраженный, характер альтеративных изменений интерфибриллярных митохондрий. Вероятно, это связано с филогенетически сформировавшейся толерантностью к повреждающему воздействию именно этого подтипа митохондрий в связи с морфофункциональными особенностями по обеспечению сократительной способности кардиомиоцитов.

Представленные данные могут быть полезны при дальнейшем изучении механизмов, лежащих в основе развития сократительной способности миокарда при патологии органов системы кровообращения [11-13].

Заключение. В результате стереологического морфометрического исследования основных подтипов митохондрий кардиомиоцитов: интерфибриллярных, субсарколеммальных и перинуклеарных, при ожоговом шоке были выявлены ультраструктурные изменения, характеризующиеся статистически значимым снижением количества крист у всех подтипов митохондрий. Наряду с этими изменениями имела место тенденция к изменению формы митохондрий, что может быть связано с набуханием

органелл, а также отмечено статистически значимое уменьшение площади перинуклеарных митохондрий.

Ультраструктурные изменения интерфибрилярных митохондрий, отражающие менее выраженное снижение количества крист этого подтипа органелл по сравнению с субсарколеммальными и перинуклеарными органеллами, могут свидетельствовать о большей толерантности этого подтипа митохондрий к альтерации кардиомиоцитов при ожоговом шоке.

Список литературы

1. Ipaktchi K., Arbabi S. Advances in burn critical care. *Crit. Care Med.* 2006. vol. 34. P. 239–244. DOI: 10.1097/01.CCM.0000232625.63460.D4.
2. Pham T., Cancio L., Gibran N. American Burn Association Practice Guidelines Burn Shock Resuscitation. *J. Burn. Care Res.* 2008. vol. 29. P. 257–266. DOI: 10.1097/BCR.0b013e31815f3876.
3. Latenser B. Critical care of the burn patient: The first 48 hours. *Crit. Care. Med.* 2009. vol. 37. no.10. P. 2819-22. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181b3a08f.
4. Kurian G.A., Berenshtein E., Saada A., Chevion M. Rat cardiac mitochondrial subpopulations show distinct features of oxidative phosphorylation during ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning. *Cell Physiol Biochem.* 2012. vol. 30. no. 1. P. 83-94. DOI: 10.1159/000339043.
5. Ayswarya A., Kurian G.A. Sensitivity of Interfibrillar and Subsarcolemmal Mitochondria to Cobalt Chloride-induced Oxidative Stress and Hydrogen Sulfide Treatment. *Indian J Pharm Sci.* 2016. vol. 78. no. 1. P. 151-158. DOI: 10.4103/0250-474x.180258.
6. Torrealba N., Aranguiz P., Alonso C., Rothermel B.A., Lavandero S. Mitochondria in Structural and Functional Cardiac Remodeling. *Adv Exp Med Biol.* 2017. vol. 982. P. 277-306. DOI: 10.1007/978-3-319-55330-6_15.
7. Picard M., Hepple R.T., Burelle Y. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2012. vol. 302. no 4. P. 629-641. DOI: 10.1152/ajpcell.00368.2011.
8. Hatano A., Okada J., Washio T., Hisada T., Sugiura S. Distinct functional roles of cardiac mitochondrial subpopulations revealed by a 3D simulation model. *Biophys J.* 2015. vol. 108. no. 11. P. 2732-2739. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.04.031.
9. Цыпленкова В.Г., Сутягин П.В., Суслов В.Б., Эттингер А.П. Особенности митохондриального аппарата кардиомиоцитов при различных заболеваниях сердца и в

эксперименте // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 8-2. С. 53-56.

10. Kalkhoran S.B., Munro P., Qiao F., Ong S.B., Hall A.R., Cabrera-Fuentes H., Chakraborty B., Boisvert W.A., Yellon D.M., Hausenloy D.J. Unique morphological characteristics of mitochondrial subtypes in the heart: the effect of ischemia and ischemic preconditioning. Discoveries (Craiova). 2017. vol. 1. P. 71. DOI: 10.15190/d.2017.1.

11. Lin L., Zhang M., Yan R., Shan H., Diao J., Wei J. Inhibition of Drp1 attenuates mitochondrial damage and myocardial injury in Cocksackievirus B3 induced myocarditis. Biochem Biophys Res Commun. 2017. vol. 484 (3). P. 550-556.

12. Haileselassie B., Mukherjee R., Joshi A.U. Brooke A Napier, Liliana M Massis, Nicolai Patrick Ostberg, Bruno B Queliconi, Denise Monack, Daniel Bernstein, Daria Mochly-Rosen. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. J. Mol Cell Cardiol. 2019. vol. 130. P. 160-169.

13. Liu J., Yan W., Zhao X. et al. Sirt3 attenuates post-infarction cardiac injury via inhibiting mitochondrial fission and normalization of AMPK-Drp1 pathways. Cell Signal. 2019. vol. 53. P. 1-13.